

がんと神経堤の EMT による幹細胞特異化制御の研究

秋田大学大学院 医学系研究科 分子生化学講座

栗山 正

1. 序論

神経堤細胞は胚性の一過的な細胞集団であり、様々な細胞に分化する幹細胞的な性格を持つと考えられている。原腸陥入の後、中枢神経系になる神経板の両側に形成され、その後、神経胚後期になって何らかのキューに従い移動を始める。この際、移動前の神経堤細胞は擬上皮細胞 (pseudoe epithelial; タイトジャンクションを持たない) であるが、組織に向かって浸潤するように移動を始める様子ががんの浸潤によく似ているため擬上皮細胞から移動する細胞になる現象を上皮間充織遷移 (EMT) として捉えている研究者も多い。厳密に EMT の定義を適用するならば移動前の神経堤細胞は上皮では無く、すでに間葉系の遺伝子マーカーを発現しているので EMT とは言えない。Jim Weston らは E-cadherin のプロモーター GFP マウスと間充織細胞マーカーの PDGF-R を用いてマウスの頭部間充織の起源が神経堤細胞の近傍にある表皮由来の細胞 (metablast) に起因する事を報告した¹。神経堤細胞に発現する EMT 関連遺伝子の Snail2 転写因子の存在意義は移動を促進するためではなく、間葉系細胞に分化するために発現しているとも考えられる。現在のところニワトリ胚においては神経上皮の EMT による神経堤細胞移動が観察されているが、他の生物種においては分布そのものが違うなどまだ研究の余地がある。我々は上皮がんが EMT に伴ってがん幹細胞の増加を示す研究に注目した²。神経堤細胞は元より未分化で移動能の高い悪性のがんとの類似性が注目されてきたが、神経堤細胞が外胚葉の EMT によって分化するモデルを示すことができればがんと神経堤の 2 つのモデルがより整合性が増すと考え、共通項を探す試みを始めた。まず、2 つのモデルに共通する因子である新規遺伝子 Cancrin の機能解析をすすめた。さらに現在知られている胚生期の神経堤細胞がすべて幹細胞性を備えているのか一部なのかを考えるため神経堤幹細胞マーカーやがん幹細胞マーカーの初期胚での発現を調べた。また細胞系譜のラベルとライブイメージングにより新たな神経堤細胞の起源が存在する可能性を検証した。検証の結果、腹側割球由来の外胚葉から神経堤細胞様の突起を伸長する細胞が見られる事が分かった。今回並行して行った 3 つの研究のリンクをさらに強めて行くことで神経堤細胞分化と EMT さらにがんととの比較に有用な共通の分子機序が明らかにできると考えている。

2. 方法

Cancrin 遺伝子過剰発現正常上皮細胞の作成

Human Cancrin 遺伝子の主要なトランスクリプトである Cancrin1.1, 1.2 をレトロウイルス及びレンチウイルスベクターに導入し、ヒト舌上皮がん細胞株 SAS, イヌ腎臓上皮細胞株 MDCKII、ヒトメラノーマ細胞株 WM115, 乳がん細胞株 MDA-MB-231, 大腸癌細胞株 HT-29 などに導入した。

アフリカツメガエル Cancrin のモルフォリノオリゴによる機能阻害

アフリカツメガエル (*X. laevis*) ゲノムをクローニングし、splicing error を起こすモルフォリノオリゴを作成した。さらに翻訳開始領域 ATG 付近の配列を元に翻訳阻害モルフォリノオリゴを作成し、8 細胞期～16 細胞期の腹側・背側境界領域に 10ng のモルフォリノを顕微注入し、既知

の神経堤細胞マーカーが見られるst. 15まで飼育し、Whole mount in situ hybridisationにより遺伝子発現を解析した。

細胞外Halo-tag導入古典的カドヘリンの作成

Xenopus laevis N-cadherinをのprodomainを欠損させたN-Δpro-cadherinにHalotagを導入した(pCSf107-XN-Halo-Δpro-cadherin)。パルスラベルが可能になった。

外胚葉のフラットマウントタイムラプスイメージング

胚の背側もしくは腹側の細胞表面をラベルし、ガラスボトムディッシュにプラスチック樹脂で胚を押しつけて固定し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3. 結果

3-1. EMTトリガー候補分子Cancrinの発現・機能解析

ヒトがん細胞株における発現は一部の乳がん、胃がん、結腸癌、子宮頸がん、膵臓癌およびメラノーマで高かった。口腔癌のSAS, 乳がん由来のMDA-MB-231細胞でも発現が確認された。細胞の状態毎の発現を調べたところ、細胞密度が上昇すると発現が減少し、オーバーコンフルエントの条件では発現が完全に消失した。これが細胞間のコンタクト依存的に起こるかどうかを調べるため、凝集させて飼育した細胞の上清を用いて低密度条件で細胞を飼育した。すると通常の培地で飼育した低密度培養条件下の発現と変化が見られなかった。このことからCancrinの発現は液性因子ではなく、細胞コンタクト依存的に負に制御されていることが示唆された。

舌がん細胞SASは上皮細胞である。SASにCancrinを導入した。SAS+CancrinにおいてE-cadherin発現が消失したが、E to Nカドヘリンシフトは検出されていない。正常細胞でもEMTに関与するかを調べるためイヌ上皮細胞株であるMDCKIIにCancrinを過剰発現したところ、E-cadherinの細胞間隙における発現が減少した。

3-2. アフリカツメガエル神経堤発生におけるXenopus Cancrinホモログの機能解析

アフリカツメガエルCancrinホモログの発現をWhole mount in situ hybridisationによって調べた。そのzygoticな発現は原腸胚後期に始まり、シュペーマンオーガナイザーの上部中内胚葉に発現する。その後、正中線上の発現は終脳前方境界部に限局し、神経堤細胞への発現が見られるようになる。アフリカツメガエルにおいて機能阻害実験を行った。その結果、Hairy2a(初期神経板境界マーカー)の変化は顕著に見られなかったものの、Msx1/Pax3/c-MycIIなどの予定神経堤領域マーカーやFoxD3, Sox9といった神経堤細胞分化マーカーが消失した。初期の反応を調べるため神経堤細胞分化マーカーが発現していない原腸胚期においてMsx-1の発現が著しく阻害された。これらの結果から神経堤細胞分化に関わるシグナルへの関与が考えられた。

次に神経堤細胞分化に関わる事が知られているWntシグナルとCancrinの関係を調べた。アフリカツメガエル腹側割球にX-Wnt8 mRNAもしくはβカテニンを注入すると頭部を持つ完全な2次軸構造を作る。Wnt又はβカテニン誘導二次軸形成がCancrin機能阻害によって軸構造が完全に欠損し、細胞塊だけが観察された。βカテニンはWntシグナルの最終標的分子であるので、カノニカル経路のコンポーネントと相互作用する分子ではなく、βカテニンそのものか、他の経路を使ってWntシグナルを制御していることが考えられた。次に背側の中胚葉における機能阻害の表現系からRnd1との相互作用が考えられ、Rnd1は膜貫通タンパクFLRT3の細胞内ドメインに結合し、C-cadherinの細胞表面から内部への取り込みに関与する。免疫沈降法によってRnd1はCancrinと直接相互作用することが分かった。さらにFLRT3の膜内ドメインのGST fusionタンパ

クを用いてプルダウンアッセイを行った。Rnd1と同様にCancrinタンパクの共沈が観察された。**CancrinはC-cadherinの分解に関わる分子と直接相互作用し、接着を介してWntを制御していることが示唆された。**

3-3. 神経堤幹細胞の胚生期における存在の検証

神経堤幹細胞は神経堤細胞が分化する3種類以上の細胞種に分化することで定義されている。神経堤幹細胞は主に発生の後期において研究がなされており、初期発生において分化した神経堤細胞がこれらの神経堤幹細胞マーカーを持つ細胞を含むのか、全てが幹細胞なのか、胚生期には存在しないのかが明らかになっていない。そこで幹細胞のマーカーの中から神経堤の形成時にすでに発現しているものを探す事にした。まずアフリカツメガエル神経堤細胞を切り集めcDNAを合成し、そのcDNAからp75NTR, CD73(間充織幹細胞), CD133, CD44(がん幹細胞)をクローニングした。P75NTRとCD73を発現する細胞が神経堤細胞の近傍に存在することは否定できないが、神経堤細胞特異的な発現パターンを示す事はできなかった。そこで頭部間充織に発現する転写因子であるMsx1に注目した。Msx1はすでに初期胚において神経板と表皮の境界領域に発現することが知られている。発現を経時的に見ていくと初期には神経堤細胞とオーバーラップするが、後期ではその輪郭にしかMsx1陽性細胞が存在しなくなる。これはMsx1発現細胞が分化してMsx1を失う事を示しており、幹細胞もしくは前駆細胞としての持つものと考えられる。

3-4. 外胚葉パルスラベリングとライブイメージング

細胞外にHalo tagを導入したカドヘリン分子を背側外胚葉に発現させ背腹の境界部分をライブイメージで捉えた。しかし、カドヘリンの消失は顕著では無かった。しかし腹側の割球を膜GFPでラベルした境界付近の細胞を追うと背側の先端で細胞突起を出す細胞がラベルされているのが観察された。

4. 考察

幹細胞マーカー候補分子Msx1の発現制御領域にGFPを繋いだトランスジェニックツメガエルを作成中である。パルスラベルで特殊な細胞が観察された部分で神経堤分化が起こるかどうかが抗体やトランスジェニックカエルを用いて調べる必要がある。Cancrinの機能解析の結果から神経堤発生において細胞接着因子の解除が関与することが明らかになった。C-cadherinの破壊による神経堤幹細胞マーカーの増加を捉える必要があるが、この際産まれる細胞はおそらく神経堤細胞の前駆細胞であり、既知のマーカーよりも現在解析中のマーカーで調べる必要がある。またCancrinの機能阻害が神経堤細胞分化を抑制し、かつWntシグナルを遮断した事から、**細胞接着の解除によるWntの活性化**が神経堤細胞分化に関わる事が予想される。これが可能なシグナリングの候補としてHippo経路が知られている³。実際Hippoの最終ターゲットであるYAPの阻害は初期神経堤マーカーのPax3を阻害する⁴。Cancrinの細胞における発現が**コンタクト依存的に制御されている**事からも、今後Hippo経路との関係を明らかにする必要がある。

5. 文献・研究成果

1. Breaux MA, Pietri T, Stemmler MP, Thiery JP & Weston JA 2008 PNAS 105, 7750-55
 2. DiMeo TA, et al. & Kuperwasser C 2009 Cancer Res 69, 5364-5373
 3. Heallen et al., & Martin JF 2011 Science 332, 458-61
 4. Gee ST, et al., & Moody SA 2011 PLoS One 6: e20309
2012. May 27 Dev. Biol. Just do itの会 「神経堤のEMTとがんのEMTのギャップを考える」